

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-070477

(43)Date of publication of application : 11.03.2003

(51)Int.Cl. C12N 15/09
A01H 1/00
C12Q 1/66

(21)Application number : 2001-267194 (71)Applicant : INST OF PHYSICAL & CHEMICAL
RES

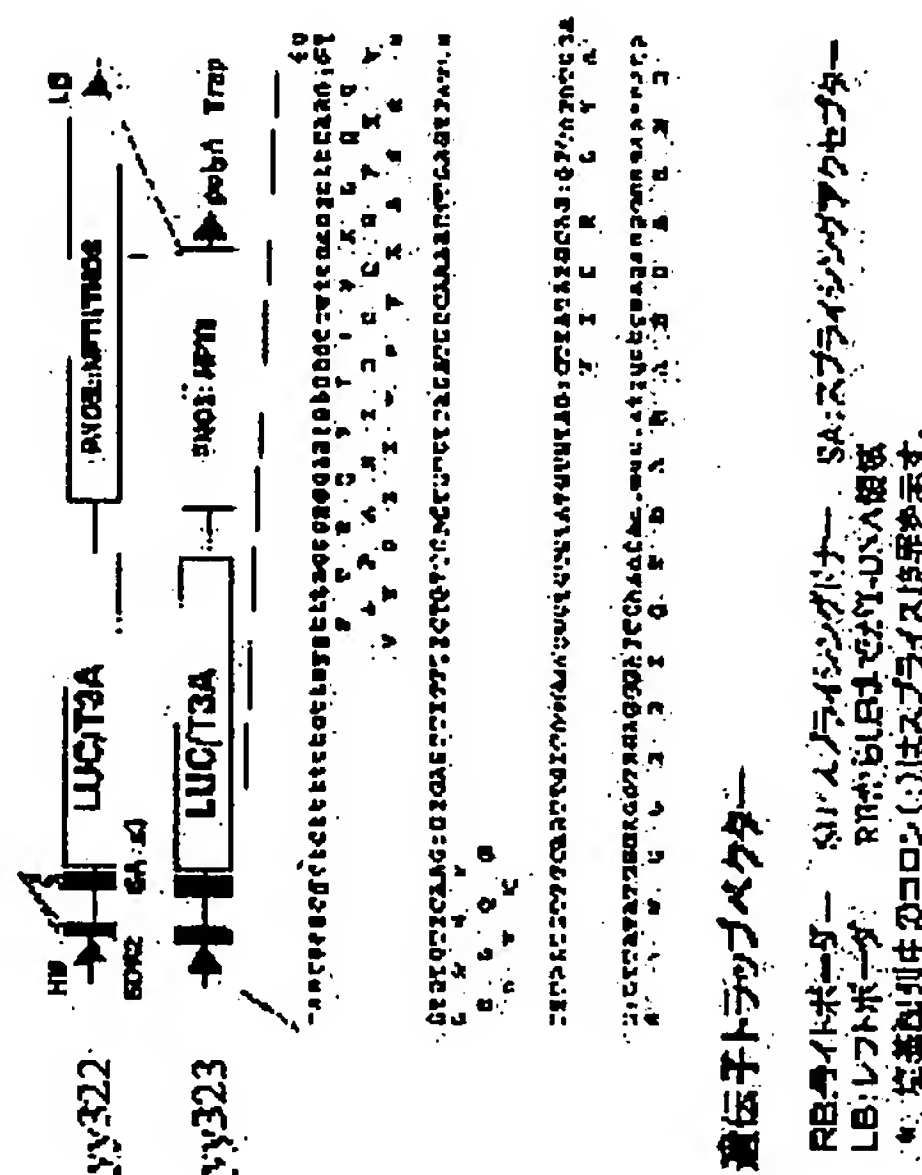
(22)Date of filing : 04.09.2001 (72)Inventor : YAMAMOTO YOSHIHARU
MATSUI MINAMI

(54) VECTOR FOR NEW PLANT GENE TRAP AND PLANT GENE TRAP UTILIZING THE SAME VECTOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To develop a new gene-searching method useful for search of genes which participate in change with time of genes in a live plant individual and environmental response.

SOLUTION: The vector for new plant gene trap comprising luciferase as a reporter gene and the plant gene-trapping method using the vector are provided.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として含む、植物の遺伝子トラップ用ベクター。

【請求項2】 請求項1記載のベクターにおいて、さらにマーカー遺伝子を機能しうる順序で含むベクター。

【請求項3】 ルシフェラーゼ遺伝子上流に、さらにスプライシング供与配列、イントロン、スプライシング受容配列をこの順序で含む、請求項1または2記載のベクター。

【請求項4】 ルシフェラーゼ遺伝子上流に、さらに終始コドン、IRES配列をこの順序で含む、請求項1または2記載のベクター。

【請求項5】 ルシフェラーゼ遺伝子上流に、さらに最小プロモーター配列を含む、請求項1または2記載のベクター。

【請求項6】 マーカー遺伝子がカナマイシン耐性、ハイグロマイシン耐性、ゲンタマイシン耐性、除草剤耐性から選ばれる少なくとも1つである、請求項2～5のいずれか1項記載のベクター。

【請求項7】 以下の工程を含む、植物の遺伝子トラップ法。

1) 請求項1～6のいずれか1項記載のベクターを植物に導入する工程

2) 上記植物から形質転換された植物を選択する工程

3) 上記形質転換植物にルシフェリンを添加し、生じる発光を計測する工程

4) 計測された発光パターンから、植物のゲノム遺伝子に関する情報を得る工程

【請求項8】 以下の工程を含む、生きた植物個体の遺伝子トラップ法。

1) 請求項1～6のいずれか1項記載のベクターを植物に導入する工程

2) 上記植物から形質転換された植物を選択する工程

3) 上記形質転換植物を生かしたままの状態、ルシフェリンを添加し、生じる発光を計測する工程

4) 計測された発光パターンから、生きた植物個体のゲノム遺伝子に関する経時的情報を得る工程

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規植物遺伝子トラップ用ベクターおよびこれを利用した植物遺伝子トラップ法に関する。さらに詳しくは、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として用いることにより、生きた植物個体における遺伝子の経時変化や環境応答に対応した遺伝子の発現を探索する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】遺伝子トラップとは、ゲノム中の遺伝子に関する情報を知るための方法の一つであり、レポーター遺伝子を含むトラップベクターをゲノム中に無作為に挿入し、その発現様式を検出することで未知の遺伝子の

発現情報を探索する手法である。この手法は、遺伝子の発現情報と共に遺伝子の破壊変異体が同時に得られる可能性が高い点が特徴である。遺伝子トラップは、大きく以下の2種類に分けられる。

【0003】1) 狭義の遺伝子トラップ：トラップベクターには転写を規定するプロモーター構造がなく、レポーター遺伝子はゲノム上の構造遺伝子内部に挿入された場合のみ、その転写開始点により転写されて融合タンパク質として発現する。あるいは、何らかの形で融合タンパク質にならずに発現する。プロモータートラップと呼ばれる場合も含む。

【0004】2) エンハンサートラップ：トラップベクターにはTATA配列等の最小プロモーターが含まれている。そのため、挿入の向きや位置にかかわらずトラップベクター内からレポーター遺伝子の転写が開始されるが、レポーター遺伝子の発現は挿入部位近傍のエンハンサーの制御を受けるため、付近に存在する遺伝子の発現パターンが反映される。

【0005】従来、遺伝子トラップに用いられるレポーター遺伝子としては、バクテリア由来のベータガラクトシダーゼ (*lacZ*) 遺伝子やベータグルクロニダーゼ (*uidA*) 遺伝子、また発光クラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子が用いられてきた。これらのレポーター遺伝子にはそれぞれ特徴があり、目的に応じて使い分けられている。レポーター遺伝子は、レポータータンパク質の活性が簡単に測定でき、そのタンパク質の活性によりレポーター遺伝子の発現状況が容易に計測出来るものでなくてはならない。

【0006】なかでも、生体を生かしたまま計測出来るGFPはレポーターとして極めて有用である。しかし、GFPにはレポーターとして次のような問題点がある。1) 蛍光による検出を行うため、もともとの生体物質由来の蛍光がノイズとして現れ、ノイズに対するシグナルの値が弱い。2) 植物細胞内では毒性があるために生体に対して中立的に発現を計測出来ない (J. Haseloff and B. Amos, 1995, Trends Genet., 11, 328-329)。3) GFPタンパク質が極めて安定なため、発現量の経時的変動を見るには不向きである (D. C. Baulcombe, S. Chapman, and S. S. Cruz, 1995, Plant J., 7, 1045-1053)。

【0007】一方、別のレポーターであるホタルのルシフェラーゼ遺伝子 (LUC) はGFP同様に生体を生かしたまま計測出来、かつ次のような利点がある (A. J. Millarら, 1992, Plant Mol. Biol. Rep., 10, 324-337)。1) 発光により検出を行うためノイズに対するシグナルの値が極めて高い。2) 植物細胞での毒性が無い。3) LUCタンパク質は植物細胞中では不安定なため、遺伝子発現の経時的変動がそのままLUC活性に反映される。4) LUCの計測にはGFPの場合のように励起光を照射する必要が無い。そのため、励起光がもたらす生体への影響を無視出来る。

【0008】他方、遺伝子トラップにおけるレポーター

の選択は生物種によってかなり異なる。たとえばlacZレポーターは大腸菌、マウス、アフリカツメガエルではよく用いられるレポーターであるが、植物で用いられた例は無い。これはおそらくlacZタンパク質は植物細胞においては非常に不安定であるか、植物の系では正しくフォールディングされないか、あるいは細胞内のpH等の環境がlacZレポーターに不適切である等の理由により、植物細胞内ではその活性が生じ難いからと考えられる。その代わりとして、植物においては同様の解析のためにGUS(beta-グルクロニダーゼ)レポーターがよく用いられている。

【0009】また、植物と動物とでは至適な利用コドンの違い等により翻訳効率が異なる。従って同一の塩基配列を持つレポーター遺伝子やプロモーターを動物用・植物用と変えただけでは、実用上十分なレベルにレポーター活性が達するかどうかを予め推測することは極めて困難である。

【0010】特開平11-332564号公報には、LUCレポーターを用いたショウジョウバエの遺伝子トラップ用ベクターが開示されているが、植物においてはLUCレポーターを遺伝子トラップに用いた例はこれまで報告がない。これは、植物においてはLUCは融合タンパク質になると活性がなくなりやすく(CK Worley, N Zenser, J Ramos, D Rouse, O Leyser, A Theologis, J Callis, Plant J, 2000, 21: 553-562)従って遺伝子トラップには適さないと信じられているためと思われる。実際、翻訳フュージョン型のトラップベクターを用いてゲノム中に無作為にLUC遺伝子を挿入したときに生じるLUC融合タンパク質が活性を持つのか、といった疑問は未だ解決されていない。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】植物の遺伝子トラップ法は、基礎研究の分野のみならず、植物/農産物の遺伝子工学を見据えた応用研究の分野においても遺伝子マイニングの一環として盛んに利用されており、ゲノム機能を解析する一手法として重要な価値をもつ。したがって、植物ゲノム解析により有用な新規遺伝子トラップの開発が望まれている。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、LUCレポーター遺伝子を組み込んだトラップベクターを数種類作成して解析を行った結果、そのうちのいくつかはトラップベクターとして極めて有用に機能しうることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下の(1)～(8)を提供するものである。

【0013】(1)ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として含む、植物の遺伝子トラップ用ベクター。

(2)前記(1)記載のベクターにおいて、さらにマーカー遺伝子を機能しうる順序で含むベクター。

(3)ルシフェラーゼ遺伝子上流に、さらにスプライ

シング供与配列、イントロン、スプライシング受容配列をこの順序で含む、前記(1)または(2)記載のベクター。

【0014】(4)ルシフェラーゼ遺伝子上流に、さらに終始コドン、IRES配列をこの順序で含む、前記(1)または(2)記載のベクター。

(5)ルシフェラーゼ遺伝子上流に、さらに最小プロモーター配列を含む、前記(1)または(2)記載のベクター。

(6)マーカー遺伝子がカナマイシン耐性、ハイグロマイシン耐性、ゲンタマイシン耐性、除草剤耐性から選ばれる少なくとも1つである、前記(2)～(5)のいずれか1に記載のベクター。

【0015】(7)以下の工程を含む、植物の遺伝子トラップ法。

1)前記(1)～(6)のいずれか1に記載のベクターを植物に導入する工程

2)上記植物から形質転換された植物を選択する工程

3)上記形質転換植物にルシフェリンを添加し、生じる発光を計測する工程4)計測された発光パターンから、植物のゲノム遺伝子に関する情報を得る工程

(8)以下の工程を含む、生きた植物個体の遺伝子トラップ法。

【0016】1)前記(1)～(6)のいずれか1に記載のベクターを植物に導入する工程

2)上記植物から形質転換された植物を選択する工程

3)上記形質転換植物を生かしたままの状態、ルシフェリンを添加し、生じる発光を計測する工程

4)計測された発光パターンから、生きた植物個体のゲノム遺伝子に関する経時的情報を得る工程

【0017】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。本発明において「遺伝子トラップ」とは、ゲノム中にレポーター遺伝子を無作為に挿入し、該レポーター遺伝子の発現様式から、挿入部位近傍の遺伝子の発現制御情報を得る方法を意味し、プロモータートラップ、エンハンサートラップなど、公知の遺伝子トラップのすべてを含む。

【0018】本発明の遺伝子トラップは、植物を対象とした遺伝子トラップである。対象となる植物種は特に限定されず、シロイヌナズナのほか、タバコ、イネ、ヒメツリガネゴケ、ミヤコグサ等、形質転換可能な植物であればよい。本発明の植物遺伝子トラップ用ベクターは、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を含み、さらにマーカー遺伝子を機能しうる順序で含むことが好ましい。

【0019】「レポーター遺伝子」とは、プロモーターやエンハンサーなどの転写活性等を調べるために組み込まれる目印用の遺伝子であって、本発明ではルシフェラーゼ(LUC)遺伝子が用いられる。該ルシフェラーゼの

由来は特に限定されず、バクテリア由来、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子のほか、LUC⁺（米国特許5,583,024号、5,674,713号等）のように人工的に合成されたルシフェラーゼ遺伝子を用いてもよい。

【0020】「マーカー遺伝子」とは、遺伝子組換え型、すなわち形質転換体の検出のために組み込まれる標識用の遺伝子であって、たとえばカナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、除草剤耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子を用いることができる。なお、本発明において「機能しうる順序」とは、組み込まれた各遺伝子とその目的を達成できる順序で存在することを意味する。

【0021】ある実施態様においては、本発明の植物遺伝子トラップ用ベクターは、LUCレポーター遺伝子上流に、スプライシング供与配列、イントロン、スプライシング受容配列をこの順序で含む。かかる配列を含むことにより、ゲノム上の遺伝子とレポーター遺伝子の読み枠が合いやすくなり、レポーター遺伝子は挿入位置にかかわらずゲノム上の遺伝子との融合タンパク質として発現する。用いるスプライシング供与配列、イントロン、スプライシング受容配列の由来は特に限定されないが、好ましくは形質転換する植物に近い種由来のものがよい。たとえば、単子葉植物を形質転換する場合は単子葉植物由来のもの、双子葉植物を形質転換する場合は双子葉植物由来のものが好ましい。

【0022】別な実施態様（通常、「エンハンサートラップ」と呼ばれる）においては、本発明のベクターは、LUCレポーター遺伝子上流に最小プロモーターを含む。ここで「最小プロモーター」とは、そのみでは下流の遺伝子を発現させることはできないが、エンハンサーが近傍にあれば下流の遺伝子を発現させることができる、TATA配列等を含むコアプロモーターを意味し、たとえばNOS101、35S90等（Puentesら、1996、EMBO J., 15, 3732-3743）を挙げることができる。前記ベクターを用いた場合、LUCレポーター遺伝子は挿入部位近傍に存在するエンハンサーの制御を受けて発現するが、レポーター遺伝子を含むmRNAはLUCタンパク質のみを単独でコードするため、ゲノム上の遺伝子との融合タンパクは発現されない。

【0023】さらに別の実施態様においては、本発明の植物遺伝子トラップベクターは、LUCレポーター遺伝子上流に、終始コドン、IRES（internal ribosome entry site）配列をこの順序で含む。このタイプのトラップベクターはマウスの系で報告されているが（B.P.Zambrowicz, G.A.Friedrich, E.C.Buxton, S.L.Lilleberg, C. Person, A.T.Sands, 1998 Nature 392, 608-611）、植物での応用例は未だ報告されていない。

【0024】「IRES配列」とは、リボソームがmRNA内部の特定領域に直接結合して翻訳を開始する内部開始機構において、該リボソームが結合するmRNA上の特定配列を

いう。植物（タバコ）で機能しうるIRES配列としては、たとえばtobamovirusのIRES-MP228、IRES-MP75およびIRES-CP148（M.V.Sskulachevら、1999、Virology, 263, 139-154）、並びにencephalomyocarditis virusのIRES-EMCV（P. Urwinら、Plant J., 2000, 24, 583-589）が報告されている。通常真核生物では、一つのmRNA上に二つのコード領域が存在するポリシストロンの場合2番目のコード領域は翻訳されないが、両者の間にIRES配列を配置しておくと、2番目のコード領域も翻訳される（M. Kozak, 2001, Mol. Cell Biol., 21, 1899-1907）。したがって、前記ベクターを用いた場合、導入されたLUCレポーター遺伝子はmRNAレベルではゲノム上の遺伝子と融合されるが、タンパク質産物としてはLUCレポーター単独として翻訳される。

【0025】本発明の植物遺伝子トラップベクターにおいては、用いられるベクターは特に限定されず、プラスミド、ファージ、コスミド、P1ベクター等公知のベクターを適宜選んで使用できる。前記ベクターの植物体への導入は、通常用いられる方法、たとえばPEG法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、レトロウィルス導入法等を用いることができるが、特にアグロバクテリアを用いたCloughらの方法（Yamamoto Y.ら2001, Plant Cell, 13 399-411; S.J.Clough and A.F.Bent, 1998 Plant J. 16 735-743）が好ましい。

【0026】本発明の植物遺伝子トラップ法において、形質転換植物におけるLUCレポーター遺伝子の発現は、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを植物に取り込ませ、生じる発光を計測することにより検出できる。発光の計測は、CCDカメラやフォトカウンティング方式のVIMカメラ（浜松ホトニクス）、シンチレーションカウンタ等、公知の方法を使用して行うことができる。

【0027】検出された発光データは、レポーター遺伝子挿入部位近傍の遺伝子の発現情報をそのまま反映し、これにより未知の遺伝子の機能や発現制御情報を得ることができる。特に、生きた植物個体に基質を投与し、ビデオカメラあるいは光電子増倍管による計測を行う方法を用いてルシフェラーゼ活性を測定すれば、生きた植物個体の遺伝子発現をリアルタイムに近いかたちで経時的にモニターできるという優れた効果を得ることができる。

【0028】

【実施例】以下、実施例により本発明についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1：融合遺伝子型植物用トラップベクターの開発とその適用例

1.1) yy322とyy323（LUC）の構築

ゲノム上の遺伝子にトラップベクターが挿入されたときに、LUCとの融合タンパク質を生じるようなベクターyy322とyy323を作成した。yy322とyy323は融合時にゲノム

上の遺伝子とレポーター遺伝子の読み枠が合いやすいように読み枠の異なる融合mRNAを複数種生じるようなデザインのコストラクトである。原理としてはNussaumeらの文献(L. Nussaumeら, 1995, Mol. Gen. Genet., 249, 91-101)に記載されているとおりであるが、本実施例ではシロイヌナズナCIP4 (Yamamoto Y.Y.ら2001, Plant Cell, 13 399-411) のスプライシングドナー部位(配列番号1)、シロイヌナズナCIP7 (Yamamoto Y.Y.ら1998 1001083-1094) のイントロン(配列番号2)並びにNussaumeらの設計したスプライシングアクセプター部位(配列番号3)を組み合わせて用いた。すなわち、これらを組合せ、部分的に重複するような二本の合成DNAを作成し、アニーリング、Klenow酵素処理による完全二本鎖化、HindIII/BamHI酵素処理による末端処理を行い、HindIII/BamHI部位への挿入可能な形状の合成DNA(HintB)を作成した(図1参照)。つまり、HintBは重複したスプライシングドナー並びにアクセプター部位を持つ改変されたCIP7のイントロンである。以下に、HintBの配列(配列番号4)を示す。

【0029】HintB: 5' -AAG CTT CAA GGT CTC TCT TC A AGG TGA GTT TTT TTC TGT TCA CTCTCT TAG ATG CCA A AA CTT GAG TTA TTG CTT AAT GTT TCA ATT GTT GTG GAC TCTGTG TAT GTG TAG GTT ATA TGC AGG TTA TAT GCA GG T TAT ATG CGA GGT CGA GGCATC C-3' (下線は制限酵素部位を示す)

上記HintBをプラスミドpPZP200A (P. Hajdukiewiczら, 1994, Plant Mol. Biol., 25, 989-994) のHindIII/BamHI部位に挿入しyy306を得た。なお、pPZP200AはDr. Pal Maliga (The State University of New Jersey)から譲与を受けた。

【0030】つぎに、プラスミドpBIN19 (M. Bevan, 1984, Nucleic Acids Res., 12 8711-8721) に含まれるPNOS/NPTII/TNOS (配列番号5) およびPNOS/NPTII (配列番号6) をPCRにより増幅した。PNOS/NPTIIは、PNOS植物プロモーターとカナマイシン耐性遺伝子をコードする配列であり、PNOS/NPTII/TNOSはこれにポリA付加シグナルが付与された配列である。なお、pBIN19は京都大学の青山教授より譲与を受けた。以下に、プライマーとPCRの反応条件を示す。

【0031】PNOS/NPTII/TNOSプライマー:

Forward: 5'-CGG GGT ACC TGA TCA TGA GCG GAG AAT TA A GCG A-3' (配列番号7)

Reverse: 5'-GGA ATT CCC GAT CTA GTA ACA TAG ATG AC A-3' (配列番号8)

PNOS/NPTIIプライマー:

Forward: 5'- GGA ATT CTC AGA AGA ACT CGT CAA GAA G GC GAT A-3' (配列番号9)

Reverse: 5'- GGA ATT CTC AGA AGA ACT CGT CAA GAA G GC GAT A-3' (配列番号10)

反応条件:

反応液: dNTP mix 0.4 mM each, primers 0.25 uM each, template DNA (pBIN19)適量 (1-100ng), 1x反応バッファー (Stratagene社 PfuTurbo 酵素に添付のもの), Pfu Turbo酵素 1-1.5 units。

【0032】サイクル条件: 94 °C 20秒, 50 °C 30秒, 72 °C 4分を30サイクル。

【0033】前記PCR反応産物をフェノール/クロロホルム抽出したのちKpnI/EcoRIにより消化し、それぞれyy306のKpnI/EcoRI部位に挿入した。PNOS/NPTII/TNOSが挿入されたものはyy309、PNOS/NPTIIが挿入されたものはyy310である。一方LUC遺伝子を含むプラスミドpG6LUC (T. Aoyama and N.-H Chua, 1997, Plant J., 11, 605-612) のSalI部位をSalI消化後Klenow処理を行うことで除去し、得られたクローンのプラスミドから同様にKpnI、そしてBamHIの部位を除去しyy319を得た。このyy319のLUC/T3A部分をPCRで増幅した。なお、pG6LUCは京都大学の青山教授より譲与を受けた。以下に、プライマーおよび反応条件を示す。

【0034】LUC/T3Aプライマー:

Forward: 5'-CCG GAT CCA AAC AAT GGC TAT GCG TGA AG A CGC CAA AAA CAT AAAGAA AG-3' (配列番号11)

Reverse: 5'-GGG GTA CCA TCG ACA CAA AAA GCC TAT AC T GTA C-3' (配列番号12)

反応条件:

反応液: dNTP mix 0.4 mM each, primers 0.75 uM each, template DNA (yy319)適量 (1-100ng程度), 1x反応バッファー (Stratagene社 PfuTurbo 酵素に添付のもの), Pfu Turbo酵素 1-1.5 units。

サイクル条件: 94 °C 30秒, 55 °C 30秒, 72 °C 4分を30サイクル。

【0035】得られたPCR産物はフェノール/クロロホルム抽出したのちBamHI/KpnIで消化し、yy309およびyy310のBamHI/KpnI部位に挿入し、それぞれyy320、yy321を得た。yy320、yy321において、植物ゲノム中に挿入されるT-DNAの右側末端RBと多重スプライシングユニットHintBとの距離を詰めるために、ベクターに含まれるScaI/HindIII部分をpPZP100のPCR産物と置換した。以下に、プライマーおよび反応条件を示す。

【0036】ScaI/HindIIIプライマー:

Forward: 5'-CCC AAG CTT TCA CAG GAT ATA TTG GCG GG T A-3' (配列番号13)

Reverse: 5'-ATA GCA CCG GAG GCG TTG GAT CAA-3' (配列番号14)

反応条件:

反応液: dNTP mix 0.4 mM each, primers 0.25 uM each, template DNA (pPZP100)適量 (1-100ng程度), 1x反応バッファー (Stratagene社 PfuTurbo 酵素に添付のもの), Pfu Turbo酵素 1-1.5 units。

サイクル条件: 94 °C 30秒, 55 °C 30秒, 72 °C 2分を30サイクル。

【0037】得られたPCR産物をフェノール/クロロホルム抽出したのちScaI/HindIIIで消化し、 ψ 320、 ψ 321に組み込んだ。 ψ 320由来のクローンは ψ 322、 ψ 321由来のクローンは ψ 323である。 ψ 322、 ψ 323のT-DNA部分の概略を図1に示す。

1.2) ψ 322、 ψ 323のシロイヌナズナへの導入

ψ 322、および ψ 323をアグロバクテリアGV3101、pMP90へエレクトロポレーション法により導入し、得られたアグロバクテリアを用いて減圧湿潤法またはフローラルディップ法によりシロイヌナズナを形質転換した(Yamamoto Y.Y.ら2001, Plant Cell, 13 399-411; S.J.Clough and A.F.Bent, 1998 Plant J. 16 735-743)。

【0038】形質転換したT1世代の種子をカナマイシン30-50 μ g/ml含むQM培地上で発芽させ、形質転換体を数百個体選抜し、生育させT2世代の自殖種子を得た。この方法によって得られた転換個体はそれぞれ独立に形質転換されており、それぞれゲノム上の異なる位置にT-DNAが挿入されている(G.-N. Ye 1999, Plant J., 19 249-257)。

【0039】1.3) T2世代のLUC発現パターンの解析

i) ARGUSビデオシステムを用いた解析

LUC活性は植物材料を生かしたまま測定可能であり、一つの方法として高感度ビデオカメラによるLUC活性の視覚化がある。Millarらの方法(A.J.Millarら 1992 Plant Mol. Biol. Rep., 10 324-337)に従い、作出した形質転換ラインのLUC活性を検出した。検出には浜松ホトニクス社のArgus50 VIM-CCDカメラシステムを用いた。

【0040】T2種子をQM培地(D. Valvekensら, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5536-5540)上で発芽、1-2週間程度生育させたところでLUC活性をARGUSシステムを用いて測定した。その結果約2-3割程度のラインからLUC活性が検出され、図2に示すように、個体全体で発現が見られたライン、緑色組織部のみで発現が見られたライン等、ラインごとに様々な組織別発現パターンが得られた。このことから、各ラインは異なるゲノム上の位置にLUCレポーター遺伝子が挿入されており、その位置に従ってLUCの発現が制御されていること、すなわち、遺伝子トラップ系として有効に機能していることが確認された。

【0041】ii) TopCountを用いたLUC活性の経時的測定
繰り返し自動測定の出来るシンチレーションカウンターを用いると、植物を生かしたまま一週間程度LUC活性を経時計測することが出来る(J. Sai and C. H. Johnson, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 11659-11663)。LUCの基質であるルシフェリンを5mM含むQM寒天培地上に前項で得たトラップラインの種子を置き、その上で一週間程度発芽・生育させ、その間の一個体ごとのLUC活性をシンチレーションカウンターにより自動測定した。測定にはPackardのTopCountを用いた。このとき、連続7日間明条件下で生育させた場合(図3)と暗所で3

日間発芽・生育させたのちに光照射し明条件下で3日間生育させた場合(図4)とでLUC活性を測定した。その結果、発芽の一時期に一過的に発現するラインや光応答を示すラインなど、ラインごとに様々なLUC発現パターンを示すことがわかった(図5)。このようにラインごとの経時変化を調べた結果からも、LUCが遺伝子トラップ系として有効に機能していることが確認された。また、LUCレポーターを用いることでトラップした遺伝子の経時変化や環境応答を解析出来ることも確認された。

10 【0042】実施例2: LUC⁺を用いたトラップベクター ψ 327 (fusionLUC) の開発

ホタルルシフェラーゼタンパク質はパーオキシゾームへの移行シグナルをC末端に持つ。この配列を取り除き、コドンをは乳細胞用に最適化したLUC⁺というルシフェラーゼの改変体が作成されている。LUC⁺は従来のLUCと比べるとより強い比活性をもつことが期待されるため、LUC⁺を用いたトラップベクターの作成を試みた。 ψ 327は ψ 323のLUC/T3A部分をLUC⁺/TNOSに置換したものである。LUC⁺を含むプラスミド221-LUC⁺は、奈良先端大学平塚先生より譲与されたものを用いた。この221-LUC⁺のLUC⁺/TNOS部分をPCRにより増幅した。以下に、プライマーと反応条件を示す。

【0043】LUC⁺/TNOSプライマー:

Forward: 5'-CGG GAT CCA AAC AAT GCC TAT GCC TGA AG A CGC CAA AAA CAT AAAGAA AG-3' (配列番号15)

Reverse: 5'-CGG GTA CCC TAT CTA GTA ACA TAG ATG A CA -3' (配列番号16)

反応条件:

反応液: dNTP mix 0.4 mM each, primers 0.75 μ M each, template DNA (ψ 319)適当量(1-100ng程度), 1x反応バッファー(Stratagene社 PfuTurbo 酵素に添付のもの), Pfu Turbo酵素 1-1.5 units。

30 サイクル条件: 94 °C 30秒, 50 °C 30秒, 72 °C 4分を30サイクル。

【0044】得られたPCR産物をフェノール/クロロホルム抽出したのちBamHI/KpnIで消化し、BamHI/KpnIで消化した ψ 323に組み込み、 ψ 327を得た。実施例1と同様の手法で前記 ψ 327を用いてシロイヌナズナを形質転換したところ、 ψ 323と同様に形質転換ラインによって異なる、多様なルシフェラーゼの発現パターンが得られた(図6)。

【0045】実施例3: IRES配列を用いたトラップベクターの開発

3.1) ψ 375 (IRES^{scv}) および ψ 376 (IRES^p) の概略
mRNAレベルではゲノム上の遺伝子との融合タイプであるものの、翻訳産物としてはルシフェラーゼのみを単独で生じるトラップベクターとして、 ψ 375と ψ 376を作成した。 ψ 375はIRESとしてIRES^{scv} (配列番号17)を、 ψ 376はIRES^p (配列番号18)を導入したコンストラクトを有する。これらのベクターは、T-DNA領域5'末端から

終止コドン、IRES配列 (C.U.T.Hellen and P Sarnow, 2001 Genes Dev 15: 1593-1612)、ルシフェラーゼ遺伝子の順に配置されることで、遺伝子トラップされると図7のようなdicistronicな構造を持つmRNAを生じる。ルシフェラーゼのコード領域は2番目のシストロンであるが、IRES活性によりルシフェラーゼが単独で翻訳される。

【0046】3.2) yy376の作成

yy327の誘導体であるyy371 (yy327のLBの外側にNPTIIのアンチセンス配列を導入し、LBより3'下流の配列が植物ゲノムに挿入されるとカナマイシン耐性が無くなるようにしたもの)のHindIII/BamHI部位にtabamovirus由来のIRES^{scv} (M.V.Skulachev, P.A.Ivanov, O.V.Karpova, T.Korpela, N.P.Rodionova, Y.L.Dorokhov, J.G.Atabekov, 1999 Virology 263, 139-154)を化学合成して挿入した。IRES^{scv}の塩基配列は図8に示す。このプラスミドをHindIII消化、Klenow酵素によるfill-inを行ったのち再びライゲーションし、得られたクローンをyy376とした。yy376を用いてシロイヌナズナを同様に形質転換したところ、yy323、yy327と同様に形質転換ラインによって多様なルシフェラーゼの発現パターンが得られた (図9)。

【0047】3.3) yy375の作成

IRES^{scv}はpIRES2-EGFP (CLONTECH社; <http://www.clontech.com>; 米国特許4,937,190)を鋳型にPCR反応により増幅したものをを用いた。以下に、プライマーと反応条件を示す。

【0048】IRES^{scv}プライマー:

Forward: 5'-GCT CTA GAT AGT TAG TTA CAT CCG CCC CTC TCC CTC CCC-3' (配列番号19)

Reverse: 5'-CGG GAT CCT GTG GCC ATA TTA TCA TCG TG T TT-3' (配列番号20)

反応条件:

反応液: dNTP mix 0.25 mM each, primers 0.75 uM eac*

* h, template DNA (pIRES2-EGFP) 適当量 (1-100ng程度), 1x反応バッファー (ベーリンガーExpandHiFidelityキットに添付のもの)、ExpandHiFidelity酵素 1 uI/100uI反応液)。

サイクル条件: 94 °C 1分, 60 °C 30秒, 72 °C 1.5分を30サイクル。

【0049】反応後QIAquickカラム (キアゲン社) をキットの説明書に従って用いてPCR産物を精製した。精製DNAをXbaI/BamHIで消化後シトシン (C) とチミン (T) のみをfill-inし、フェノール抽出しライゲーション反応に用いた。一方yy371をHindIII消化後、アデニン (A) とグアニン (G) のみをfill-inし、フェノール抽出した後BamHIによる消化、脱リン酸化処理を行った後用意したIRES^{scv}とライゲーションし、得られたクローンをyy375とした。yy375の構造を図10に示す。

【0050】yy375を用いて実施例1と同様にシロイヌナズナを形質転換したところ、yy323、yy327およびyy376と同様に形質転換ラインによって多様なルシフェラーゼの発現パターンが得られた (図11)。以上のとおり、LUC⁺を用いたベクターやIRES配列を組み込んだベクターにおいても、本発明のベクターが有効に機能していることが確認された。また、LUCレポーターを用いることでトラップした遺伝子の経時変化や環境応答を解析出来ることも確認された。

【0051】

【発明の効果】本発明の植物遺伝子トラップ用ベクターを用いれば、従来のトラップ用レポーター遺伝子 (lacZ, uidA, GFP等) では不可能であった遺伝子の経時的解析が可能になる。また、傷害や病原菌等のストレスにตอบสนองする遺伝子並びにその遺伝子破壊株の検索も可能になる。

【0052】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN Genomic Sciences Center
 <120> A new vector for plant gene trapping comprising the luciferase reporter gene and the use thereof
 <130> RJH13-064T
 <160> 20
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial Splicing Donor
 <400> 1
 aaggtctctc ttcaaggtga gttttt

<210> 2

<211> 88

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

gtgagttttt ttctgttcac tctcttagat gccaaaactt gagttattgc ttaatgtttc 60
aattgttggt gactctgtgt atgtgtag 88

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificial Splicing Acceptor

<400> 3

taggttatat gcaggttata tgcaggtta 29

<210> 4

<211> 157

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> intron

<222> (24)...(111)

<223> Description of Artificial Sequence:HindB(modified intron of CIP7)

<400> 4

aagcttcaag gtctctcttc aaggtgagtt ttttctgtt cactctctta gatgccaaaa 60
cttgagttat tgcttaattt ttcaattgtt gtgactctg tgtatgtgta ggttatatgc 120
aagttatatg caggttatat gggaggtgga gggatcc 157

<210> 5

<211> 1771

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> promoter

<222> (13)...(326)

<221> polyA₁ signal

<222> (1123)...(1764)

<223> Description of Artificial Sequence:PNOS/NPTII/TNOS

<400> 5

ggtacctgat catgagcggg gaattaaggg agtcacgtta tgacccccgc cgatgacgcg 60
ggacaagccg ttttacgttt ggaactgaca gaaccgcaac gttgaaggag ccactcagcc 120
gcgggtttct ggaagttaat gagctaagca catacgtcag aaaccattat tgcgcgttca 180
aaagtcgcct aaggtcacta tcagctagca aatatttctt gtcaaaaatg ctccactgac 240
gttcataaaa ttccccctcg tatccaatta gagtctcata ttactctca atccaaataa 300
tctgcaccgg atctggatcg ttctgcata ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 360
cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 420
ctgatgccgc cgtgttcggt ctgtcagcgc agggcgcgcc ggttcttttt gtcaagaccg 480
acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagg acgagcgagc gcggctatcg tggctggcca 540
cgacggcgt tccttgccga gctgtgctcg acgttgctac tgaagcggga agggactggc 600
tgctattggg cgaagtgcgg gggcaggatc tctgtcatc tcaccttgc tctgccgaga 660

15

16

aagtatccat catggtgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 720
 cattcgacca ccaagcgaac catcgcatcg agcgaacacg tactcggatg gaagccggtc 780
 ttgtcgatca ggaatgatctg gacgaagagc atcaagggct cgcgccagcc gaactgttcg 840
 ccaggctcaa ggcgcgcacg cccgacggcg atgatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct 900
 gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc 960
 tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc 1020
 ttggcggcga atgggtgac cgttctctcg tgccttacgg tatcgccgct cccgattcgc 1080
 agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc tggggttcga 1140
 aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt 1200
 ctatgaaagg ttgggttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tctccagcg 1260
 cggggtatct atgctgagt tcttcgccc cgggatctct gcggaacagg cggtcgaagg 1320
 tggcgatctc attacgacg caacggccga caagcacaac gccacgatcc tgagcgacaa 1380
 tatgatcggg cccggcgtcc acatcaacgg cgtcggcgcc gactgcccag gcaagaccga 1440
 gatgcaccgc gatatcttcg tgcgttcgga tattttcgtg gaggttcccgc cacagaccgc 1500
 gatgatcccc gatcgttcaa acatttgcca ataaagtctc ttaagattga atcctgttcg 1560
 cggctcttcg atgattatca tataatttct gttgaattac gttgaagcat taataattaa 1620
 catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtc cgcattata 1680
 catttaatac gcgatagaac acaaaatata gcgcgcaac taggataaat tatcgccgc 1740
 ggtgtcatct atgttactag atcgggaatt c 1771

<210> 6

<211> 1127

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> promoter

<222> (13)...(326)

<223> Description of Artificial Sequence:PNOS/NPTII

<400> 6

ggtacctgat catgagcga gaattaagg agtcacgta tgcacccgc cgtgacgcg 60
 ggacaagccg ttttacgttt ggaactgaca gaaccgcaac gttgaaggag ccactcagcc 120
 gcgggtttct ggaattaat gagtaagca catagtcag aaaccattat tgcgcgttca 180
 aaagtcgcct aaggtcacta tcagctagca aatatttctt gtcaaaaatg ctccactgac 240
 gtccataaaa ttcctctcgg tatccaatta gagtctcata ttactctca atccaaataa 300
 tctgcaccgg atctggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 360
 cggccgcttg ggtgagagg ctattcggct atgactggc acaacagaca atcggctgct 420
 ctgatgccgc cgtgttccgg ctgacagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg 480
 acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagc acgaagcagc gcgctatcg tggctggcca 540
 cgacggcgct tcttgcgca gctgtgctcg acgttgctac tgaagcggga agggactggc 600
 tgctattggg cgaagtgcg ggcaggatc tctgtcatc tcaccttgc cctgccgaga 660
 aagtatccat catggtgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 720
 cattcgacca ccaagcgaac catcgcatcg agcgaacacg tactcggatg gaagccggtc 780
 ttgtcgatca ggaatgatctg gacgaagagc atcaagggct cgcgccagcc gaactgttcg 840
 ccaggctcaa ggcgcgcacg cccgacggcg atgatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct 900
 gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc 960
 tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc 1020
 ttggcggcga atgggtgac cgttctctcg tgccttacgg tatcgccgct cccgattcgc 1080
 agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agaattc 1127

<210> 7

<211> 34

17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

cggggtacct gatcatgagc ggagaattaa gggg

34

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

ggaattcccg atctagtaac atagatgaca

30

<210> 9

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

ggaattctca gaagaactcg tcaagaaggc gata

34

<210> 10

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

ggaattctca gaagaactcg tcaagaaggc gata

34

<210> 11

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

cgggatccaa acaatggcta tggctgaaga cgcacaaaac ataaagaaag

50

<210> 12

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

ggggtaccat cgacacaaaa agcctatact gtac

34

<210> 13

<211> 31

19

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13

cccaagcttt gacaggatat attggcgggt a

31

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14

atagcagcgg aggggttggg tcaa

24

<210> 15

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 15

cgggatccaa acaatggcta tggctgaaga cgcacaaaac ataaagaaa

50

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16

gggtaccct atctaatac ataagtaca

30

<210> 17

<211> 156

<212> DNA

<213> Tobamovirus Ob

<220>

<223> Internal ribosome entry site

<400> 17

agcttagata gatagcgatt cgggtgcagc atttaaagcg gttgacaact ttaaaagaag 60

gaaaaagaag gttgaagaaa aggtgtagt aagtaagtat aagtacagac cggagaagta 120

cgccggtcct gattcgttta atttgaaga agaaac

156

<210> 18

<211> 590

<212> DNA

<213> encephalomyocarditis virus

<220>

<223> Internal ribosome entry site

<400> 18

gatccgccc tctccctccc cccccctaa cgttactggc cgaagccgt tggataaag 60

ccggtgtgcg tttgtctata tttattttc caccatattg ccgtctttg gcaatgtgag 120

21

22

ggcccggaaa cctggccctg tcttcttgac gaqcatctct aggggtcttt cccctctcgc 180
 caaaggaatg caaggtctgt tgaatqtcgt gaaggaagca gttcctctgq aaqcttcttq 240
 aagacaaaca acgtctgtag cgaccctttg caggcagcgg aacccccac ctggcgacag 300
 gtgcctctgc qgcaaaaagc cacgtgtata agatacacct gcaaaagcgg cacaacccca 360
 gtgccacgtt gtgagttgga tagttgtgga aagagtcata tggctctcct caagcgtatt 420
 caacaagggg ctgaaggatg cccagaaggt accccattgt atgggatctg atctggggcc 480
 tcggtacaca tgctttacat gtgttttagtc gaggttaaaa aaacgtctag gccccccgaa 540
 ccacggggac gtggttttcc ttgaaaaac acgatgataa tatggccaca 590

<210> 19

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 19

gctctagata gttagttaga tccgcccctc tccctcccc

39

<210> 20

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20

cgggatcctg tggccatatt atcatcgtgt tt

32

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、yy322とyy323のT-DNA部分の概略を示す。

【図2】図2は、yy322とyy323による形質転換植物のルシフェラーゼ活性（ビデオカメラ画像）を示す。

【図3】図3は、明所7日間のルシフェラーゼ活性を示す。

【図4】図4は、暗所3日間明所3日間のルシフェラーゼ活性を示す。

【図5】図5は、芽生えの発達時に一過的に発現するラインのルシフェラーゼ活性（上グラフ）および形質転換*

* 植物の環境応答による分類（下枠内）を示す。

【図6】図6は、yy327による形質転換植物のルシフェラーゼ発現パターンを示す。

【図7】図7は、IRESを用いた遺伝子トラップの概略を示す。

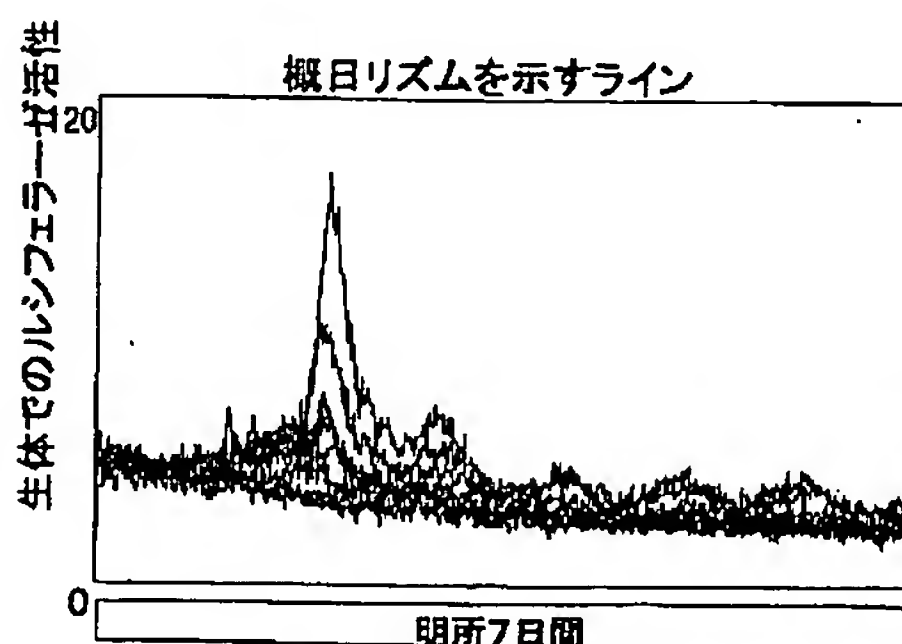
【図8】図8は、yy376の構造を示す。

【図9】図9は、yy376による形質転換植物のルシフェラーゼ発現パターンを示す。

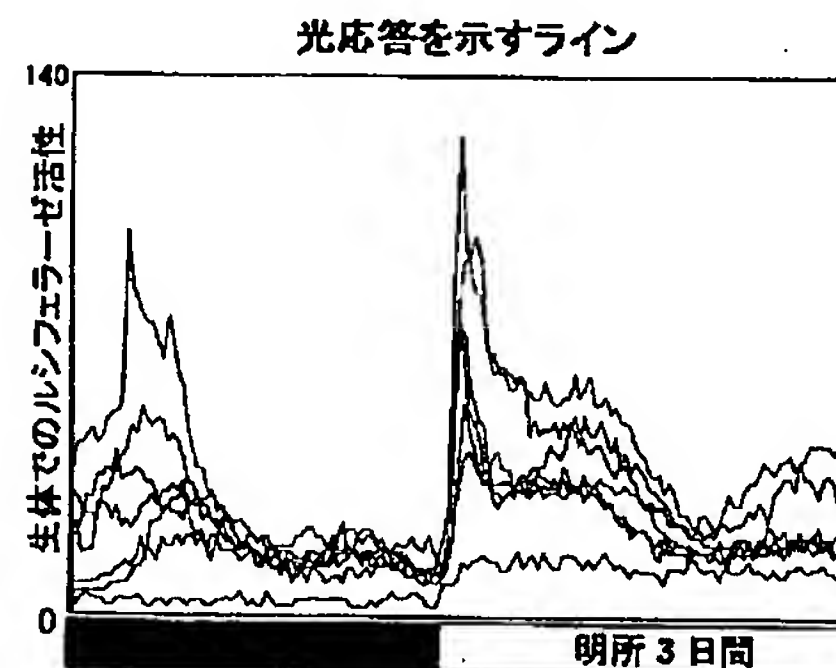
【図10】図10は、yy375の構造を示す。

【図11】図11はyy375による形質転換植物のルシフェラーゼ発現パターンを示す。

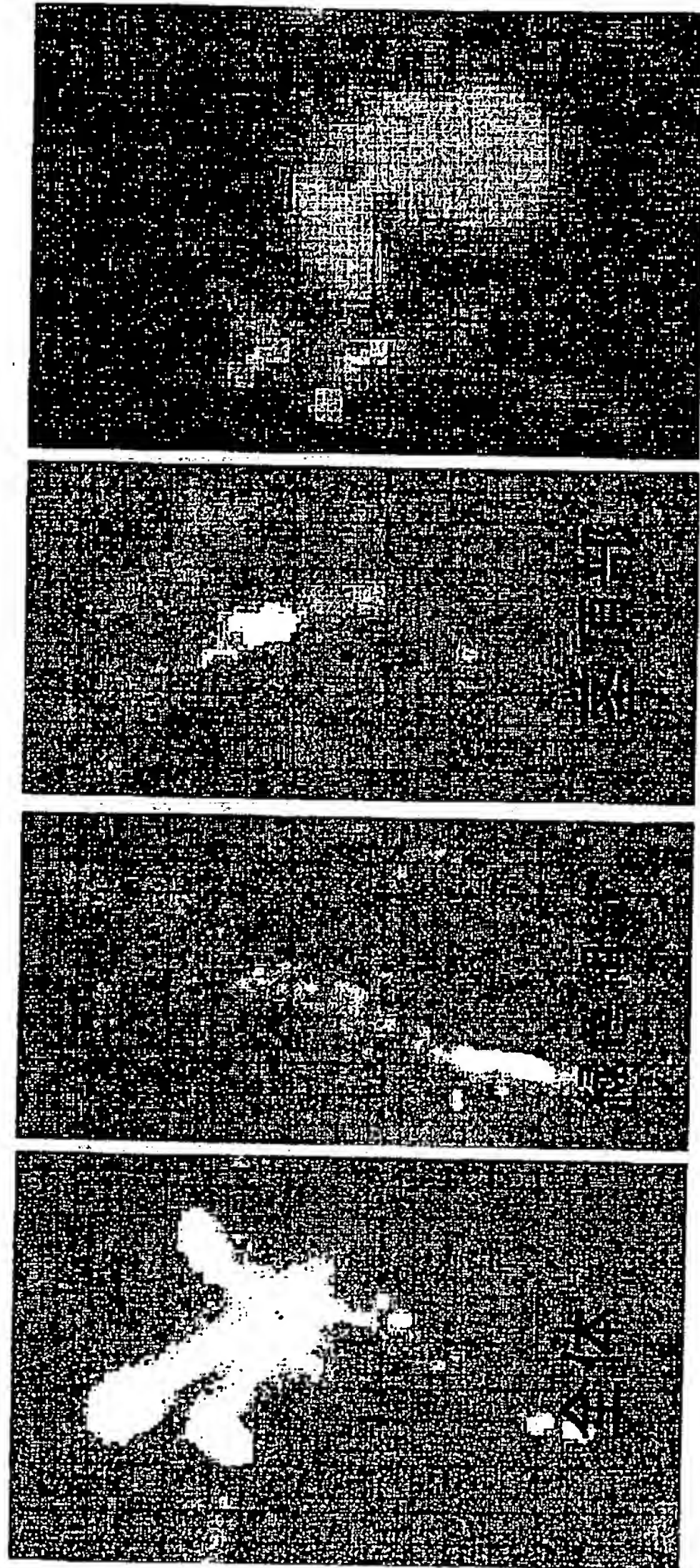
【図3】



【図4】



【図2】

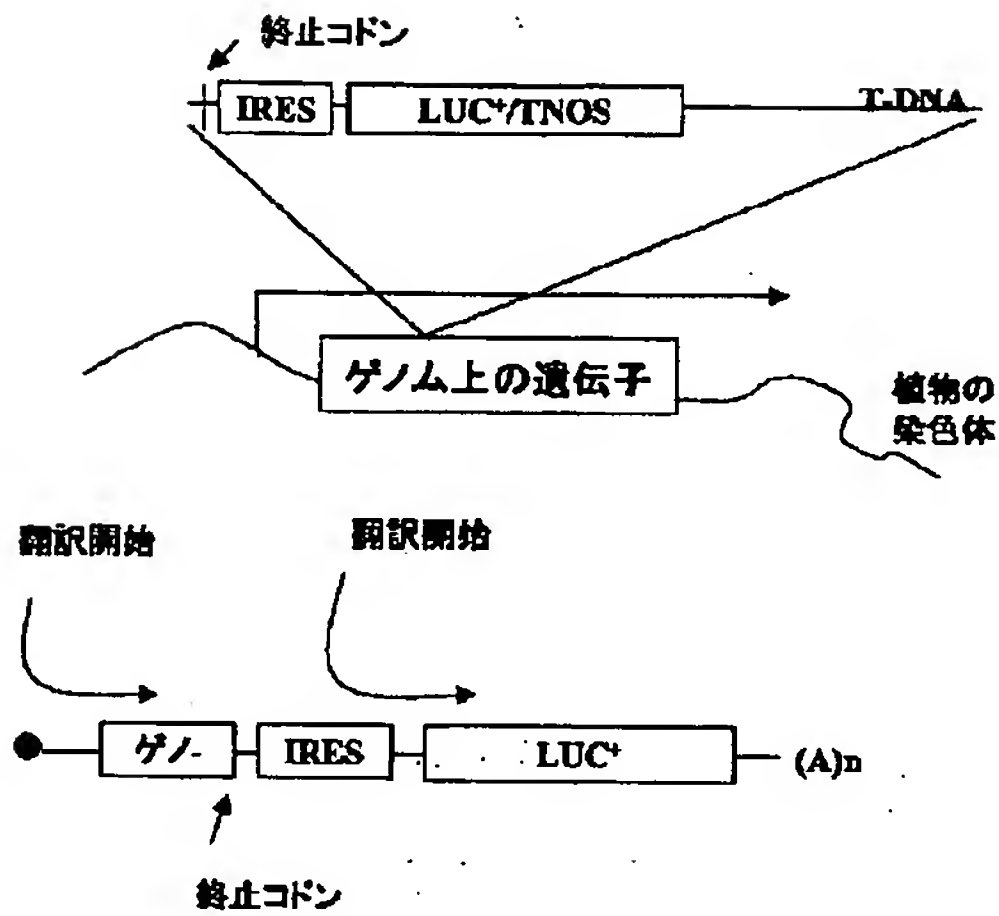


分類:	
全体	45%
緑色組織	41%
茎頂部	8.4%
根	6.3% (n=95)

ルシフェラーゼ活性のビデオカメラによる検出

(カラー:ルシフェラーゼ活性 白黒:可視光下で見た植物)

【図7】



IRES (Internal Ribosomal Entry Site)を用いた遺伝子トラッピング

上図) ゲノムへのT-DNAの挿入と転写

下図) 転写産物の翻訳 ●: キャンプ構造 (A)_n: ポリA配列
挿入された側の遺伝子の3'側の領域(図でいう「ゲノム上の遺伝子」)は
転写産物に含まれず、従って遺伝子としては破壊されている。

【図8】

5'-pAGCTTAGATAGATAGCGATTTCGGTTGCAGCATTTAAAGCGGTTGACAAC
3'- ATCTATCTATCGCTAAGCCAACGTCGTAAATTTGCGCAACTGTTG
TTTAAAGAAGGAAAAAGAAGGTTGAAGAAAAGGGTGTAGTAAGTAAGTA
AAATTTTCTTCTTTTCTTCCAACCTCTTTTCCACATCATTTCAT
TAAGTACAGACCGGAGAAGTACGCCGGTCTGATTGTTTAATTTGAAAG
ATTCATGTCTGGCTCTTCATGCGGCCAGGACTAAGCAAATTAACTTTC
AAGAAAC -3'
TTCTTTGCTAGp-5'



yy376 (IRES^{CP})の構造

上図: IRES^{CP}の塩基配列 下図: yy376のRB側の概略

* 下線は終止コドンを示す。3フレームすべてに対して終止コドンが来るように読み枠をずらして3つ配置している。

【図10】

-(RB)-TAGATAGTIAAGTTAGATCGGCCCTCTCCCTCG-(IRES^{EmoV})-(LUC⁺)-

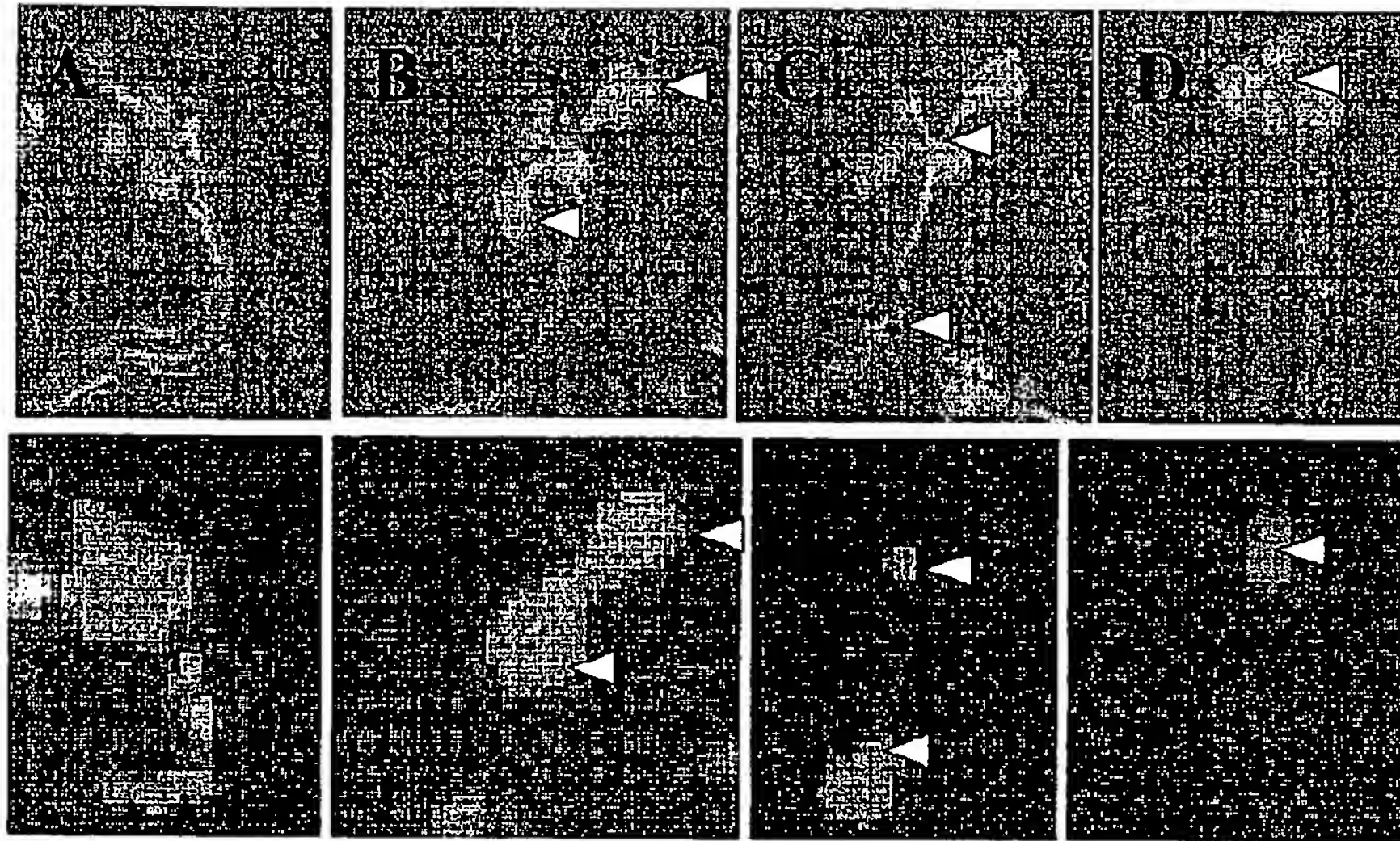


yy375 (IRES^{EmoV})の構造

上図: RBとIRES^{EmoV}の結合部分 下図: yy375のRB側の概略

* yy376と同様にRBとIRESの間に終止コドンがすべての読み枠で生じるように配置されている(下線)。太字はIRES^{EmoV}

【図9】



yy376(IRES^{CP})を用いた遺伝子トラップラインでのルシフェラーゼ 発現パターン

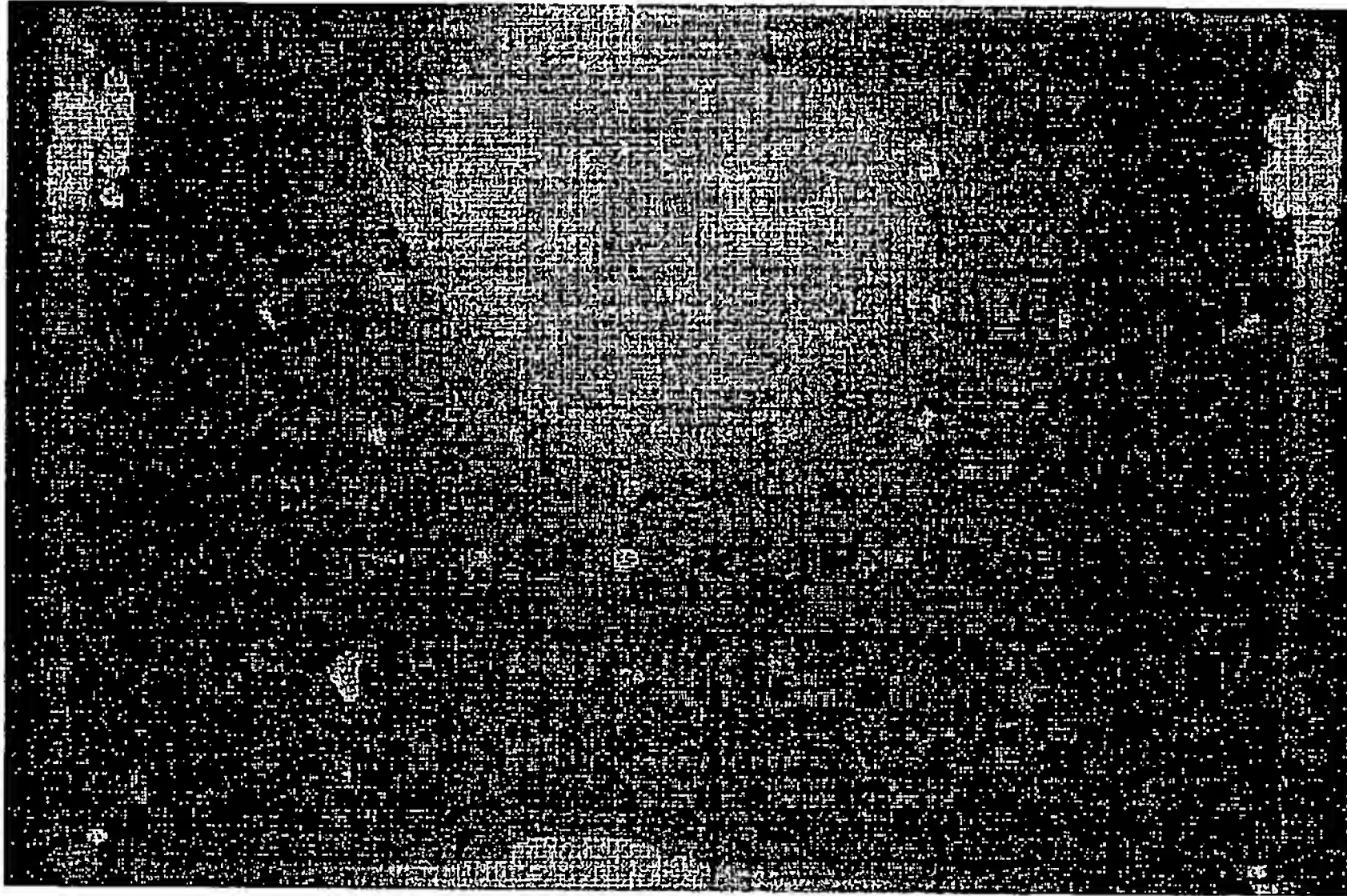
上図: T1世代のそれぞれ独立した形質転換ライン(4ライン)

下図: 高感度ビデオカメラシステムで検出したルシフェラーゼによる発光パターン

* T-DNAが挿入されたゲノム上の位置に従って、全身(ライン)(A)、子葉のみ(B)、
茎頂部並びに根部(C)、茎頂部のみ(D)で発現する個体が観察された。

白三角は上図と下図の対応部位を示す。

【図11】



yy375(IRES^{EMCV})を用いた遺伝子トラップラインでの
ルシフェラーゼ発現パターン

フロントページの続き

F ターム(参考) 2B030 CA15 CA17 CA19
4B024 AA08 BA11 CA01 DA01 FA10
GA11 CA17
4B063 QA01 QA18 QQ04 QQ09 QQ30
QR58 QS26, QX02

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.